INFLUENCE DE LA MONENSINE SUR L'ULTRASTRUCTURE ET LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES FRACTIONS PARIETALES DU *BOTRYTIS CINEREA*.

YAHYA KOULALI[1-2], ABBES ES-SGAOURI[1] et ROBERT DARGENT[2](*)

[1]Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales,
Faculté des Sciences I — Ain Chock,
Université Hassan II, Km 8, Route El Jadida,
B.P. 5366 Maarif, Casablanca, Maroc.
[2]Laboratoire de Mycologie Végétale,
Université Paul Sabatier, 118, Route de Narbonne,
31062 Toulouse CEDEX, France

(*). Auteur à qui faire parvenir toute correspondance.

RÉSUMÉ : Les effets de la monensine sur la morphogenèse et la composition chimique des différentes fractions pariétales du *Botrytis cinerea* ont été étudiées. Cet ionophore inhibe la croissance, modifie l'ultrastructure et induit des variations dans la proportion des différents monomères qui se traduisent par la diminution des oses neutres et des acides aminés et l'augmentation du phosphore inorganique et des oses aminés (chitine) en particulièr dans la fraction 4. Ces modifications montrent que la monensine affecte le trafic vésiculaire ainsi que les enzymes responsables de la synthèse pariétale et donc d'une croissance normale.

MOTS CLEFS : *Botrytis cinerea* ; Monensine ; Ultrastructure ; Fractions pariétales.

SUMMARY : The effects of monensin on morphogenesis and chemical composition of wall fractions of *Botrytis cinerea* were studied. The ionophore inhibits the fungal growth, modifies the ultrastructure and induces modifications of various monomers. We observed the decrease of neutral sugars, amino acids and uronic acids, and an increase of inorganic phosphorus and amino sugars (chitin) specially in fraction F4. These results show that monensin affects the vesicular traffic and enzymes responsible for normal wall synthesis and therefore normal growth.

KEY WORDS : *Botrytis cinerea* ; Monensin ; Ultrastructural ; Wall fractions.

INTRODUCTION

Les champignons filamenteux ont un mode de croissance apicale caractérisé par une distribution polarisée des différents systèmes endomembranaires (Wessels, 1986).

L'insertion de façon continue de nouveaux matériaux dans la paroi cellulaire au niveau de l'apex, assure la croissance de l'hyphe fongique (Prosser & Trinci, 1979 ; Gooday & Trinci, 1980). De plus, les précurseurs pariétaux, les enzymes et leurs substances régulatrices sont transportés à l'apex dans des vésicules golgiennes, suivant des processus sécrétoires très organisés (Cabib *et al.*, 1979 ; Gooday, 1983). La monensine, ionophore carboxylique qui se lie aux ions Na^+, K^+ et à des protons (Pressman & Fahim, 1982) provoque la vacuolisation de l'appareil de Golgi et modifie ainsi les processus sécrétoires aussi bien chez les cellules animales que végétales (Mollenhauer *et al.*, 1990 ; Calzoni *et al.*, 1993 ; Ciampolini *et al.*, 1993 ; Kimura *et al.*, 1993 ; Hoffmann-Benning *et al.*, 1994 ; Bou-Gharios *et al.*, 1994).

Des travaux ont montré que les champignons sont sensibles à la monensine (Liu, 1982). L'ionophore a une influence sur la morphogenèse fongique (Poli *et al.*, 1986 ; Sewall *et al.*, 1986 ; Pancaldi *et al.*, 1994). Il inhibe la croissance et la biosynthèse des lipides (Weete *et al.*, 1989 ; Fonvieille *et al.*, 1991) ainsi que la sécrétion des cutinases chez *Fusarium solani* (Podila *et al.* 1995). Dans un précédent travail (Koulali *et al.*, 1992, 1996a,b), nous avons montré que la monensine modifie la composition globale des parois, du plasmalemme ainsi que la sécrétion et la structure des exopolysaccharides de champignons appartenant à différents groupes taxonomiques. Dans le présent travail nous décrirons les effets de la monensine sur la croissance, l'ultrastructure et la composition des différentes fractions pariétales du *Botrytis cinerea*.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

Botrytis cinerea Pers. provient du Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn (Pays-Bas).

Techniques générales

Le milieu expérimental de culture a été décrit antérieurement par Thomas (1972). Ce milieu liquide a été mis dans des fioles de Roux à section trapézoïdale à raison de 100 ml par fiole puis stérilisé à l'autoclave à 110° C pendant 20 min. Les ensemencements ont été faits à partir d'une suspension mycélienne issue de précultures âgées de 6 jours, broyées stérilement à l'ultra turax pendant 30 secondes.

Préparation de la monensine

A partir d'une solution mère de monensine dissoute dans l'éthanol à 90° (50 µg/ µl), nous avons effectué des dilutions de telle manière à obtenir la concentration de 10 µg/ml. La monensine est ajoutée aseptiquement au milieu de culture avant l'ensemencement.

Conditions de développement

Les cultures en condition statique sont mises à incuber à 24° C et à l'obscurité.

Mesure de la croissance

La détermination de ce paramètre est réalisée par la technique des masses sèches. A intervalles réguliers, le mycélium est desséché à 80° C jusqu'à masse constante (24 h). Les résultats représentent la moyenne des masses obtenues à partir de cinq erlenmeyers de culture récupérées tous les 2 jours.

Techniques microscopiques

Afin d'avoir des hyphes facilement orientables et dans le but d'obtenir des coupes ultrafines passant au niveau des zones apicales, nous avons repris une technique décrite par Dargent (1977). L'inoculum de *B. cinerea* est déposé sur un film de cellophane recouvrant un milieu nutritif gélosé (avec et sans monensine). Quand la culture, dont l'âge n'excède jamais 48 heures, a atteint le développement souhaité, nous découpons délicatement le film de cellophane en suivant rigoureusement les bords de la colonie. Ensuite, nous plongeons très rapidement l'ensemble cellophane, filaments mycéliens dans une solution de glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,2 évitant ainsi les risques d'artéfacts au niveau des zones apicales des filaments. Après post-fixation dans le tétroxyde d'osmium, les échantillons sont deshydratés dans l'alcool. A la fin de la déshydratation, nous découpons de petits carrés d'1 mm2 environ, en ayant soin de ne prendre que la zone terminale des hyphes. Ces carrés, après imprégnation dans l'Epon 812 ou le Spurr sont déposés à plat dans une goutte de résine fraîche, à la surface d'une gélule tronquée. Après polymérisation, des coupes longitudinales passant dans les zones apicales des filaments sont obtenues sur ultramicrotome Reichert OMU3. Comprises entre 400 et 800 Å elles sont recueillies soit sur des grilles en cuivre de 200 mesh et soumises à la double coloration acétate d'uranyle-citrate de plomb, soit sur des grilles en or et soumises à la coloration de Thiery (1967) pour la mise en évidence des groupements vic-glycol.

Les fractions pariétales sont mises en suspension aqueuse par passage rapide aux ultrasons et une goutte est disposée sur une grille en cuivre de 200 mesh. Un ombrage rotatif au platine est effectué sous un angle d'environ 10 degrés sous un évaporateur rotatif Riber.

Toutes les observations sont faites avec un microscope Philips EM 301 travaillant sous une tension de 80 KV.

Préparation du complexe WGA-or colloïdal et marquage cytochimique

L'or colloïdal (Au17) a été préparé selon la méthode de Geoghegan & Ackerman (1977). La WGA (IBF) a été conjuguée à la suspension d'or colloïdal suivant la technique décrite par Roberts *et al.* (1983). Pour le marquage cytochimique, les coupes sont montées sur grilles en or ou nickel. Ces grilles sont d'abord déposées sur une goutte de tampon phosphate (P.B.S.) 0,05 M, pH 7,0, puis mises sur le complexe WGA-or colloïdal durant des temps variables de 20 minutes à 2 heures. Après incubation, les coupes soigneusement

lavées dans du tampon P.B.S. et dans de l'eau distillée sont soumises à la double coloration acétate d'uranyle-citrate de plomb. Pour démontrer la spécificité du marquage, plusieurs témoins sont réalisés :

— incubation des coupes avec le complexe WGA-or colloïdal préalablement neutralisé avec le N-N'-N" triacétylchitotriose (2mM).

— incubation des coupes avec le complexe albumine-or à la place du complexe lectine-or.

— incubation des coupes avec l'or colloïdal seul.

Isolement, purification et fractionnement des parois

L'isolement et la purification des parois ont été décrits antérieurement (Koulali *et al.*, 1992). Le fractionnement est réalisé selon la méthode de Mahadevan & Tatum (1965) par traitement successifs aux alcalis et aux acides résumés dans la Fig. 1.

Techniques biochimiques

L'hydrolyse des fractions pariétales en vue de l'analyse des oses neutres a été réalisée à l'aide d'H_2SO_4 22 N pendant 5 min à 50° C et d'H_2SO_4 2 N pendant 15 h à 100° C (Harris & Taber, 1973). Les oses neutres totaux ont été dosés par la méthode à l'anthrone (Mokrash, 1954), par celle au phénol sulfurique (Hodge & Hofreiter, 1962), ou par celle des oses réducteurs selon Somogyi (1952). Le dosage des acides uroniques a été effectué à partir du même hydrolysat selon la méthode de Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973).

En vue de l'analyse des oses aminés, les fractions pariétales ont été hydrolysées à l'HCl 6 N pendant 6 h à 100° C. Les hydrolysats ont été récupérés par filtration, évaporés à sec et repris plusieurs fois par l'eau distillée jusqu'à élimination complète de l'acide. Le dosage des oses aminés a été effectué en utilisant la méthode d'Elson-Morgan modifiée (Tracey, 1955). Le dosage des acides aminés totaux provenant d'une hydrolyse à l'HCl 6 N pendant 15 h à l'étuve, à 100° C, a été réalisé selon la méthode de Spies (1957).

RESULTATS

Dans des expériences préliminaires, nous avons déterminé la tolérance de plusieurs espèces de champignons vis-à-vis de la monensine et constaté que le *B. cinerea* était l'une des espèces les plus sensibles à cet effecteur. La concentration de 10 µg/ml de monensine, seulement fongistatique, représente la concentration minimale qui donne le maximum d'effets (Koulali, 1992).

Évaluation de la croissance :

Nous avons étudié la croissance du *B. cinerea* sur milieu synthétique dans lequel nous avons ajouté de la monensine à la concentration de 10 µg/ml. Durant cette expé-

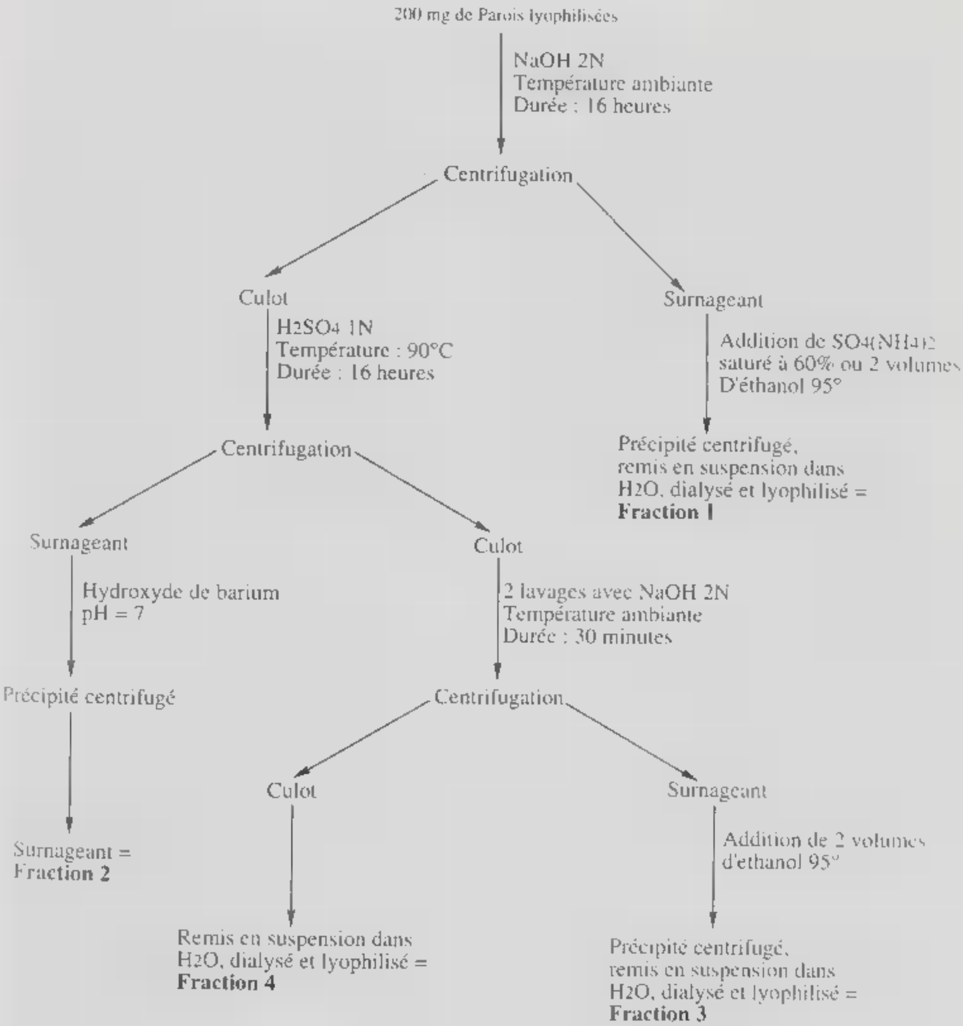


Fig. 1 : Fractionnement des parois selon Mahadevan & Tatum (1965)

rience, nous avons pris soin de réaliser deux contrôles : le milieu synthétique avec le solvant (10 µl d'éthanol) et le milieu synthétique seul. Toutefois, comme la présence du solvant n'entraîne aucune modification de la croissance et qu'il y a une grande similarité entre les masses sèches obtenues en fonction du temps, nous ne donnerons qu'une courbe témoin. La figure 2 résume les résultats obtenus. Nous constatons que la courbe témoin est caractéristique des courbes de croissance fongique : (i) une phase de latence n'excédant jamais plus de 48 h ; (ii) une croissance exponentielle caractérisée par un important accroissement de la masse, le maximum de croissance étant atteint au 12e jour de culture ; (iii) enfin un état stationnaire, caractérisé par une masse de matière sèche stable.

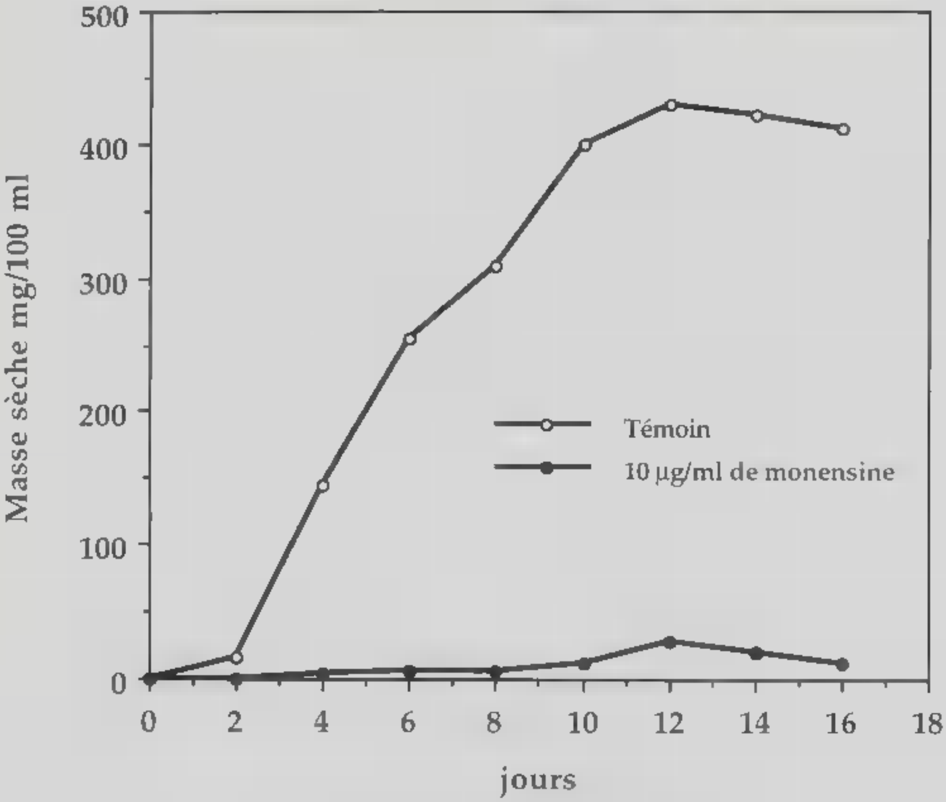


Fig. 2 : Effet de la monensine sur la croissance du B. cinerea

Fig. 3. — Organisation cytologique des zones apicales en croissance du *Botrytis cinerea*.

a-b-d-e : glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb ;

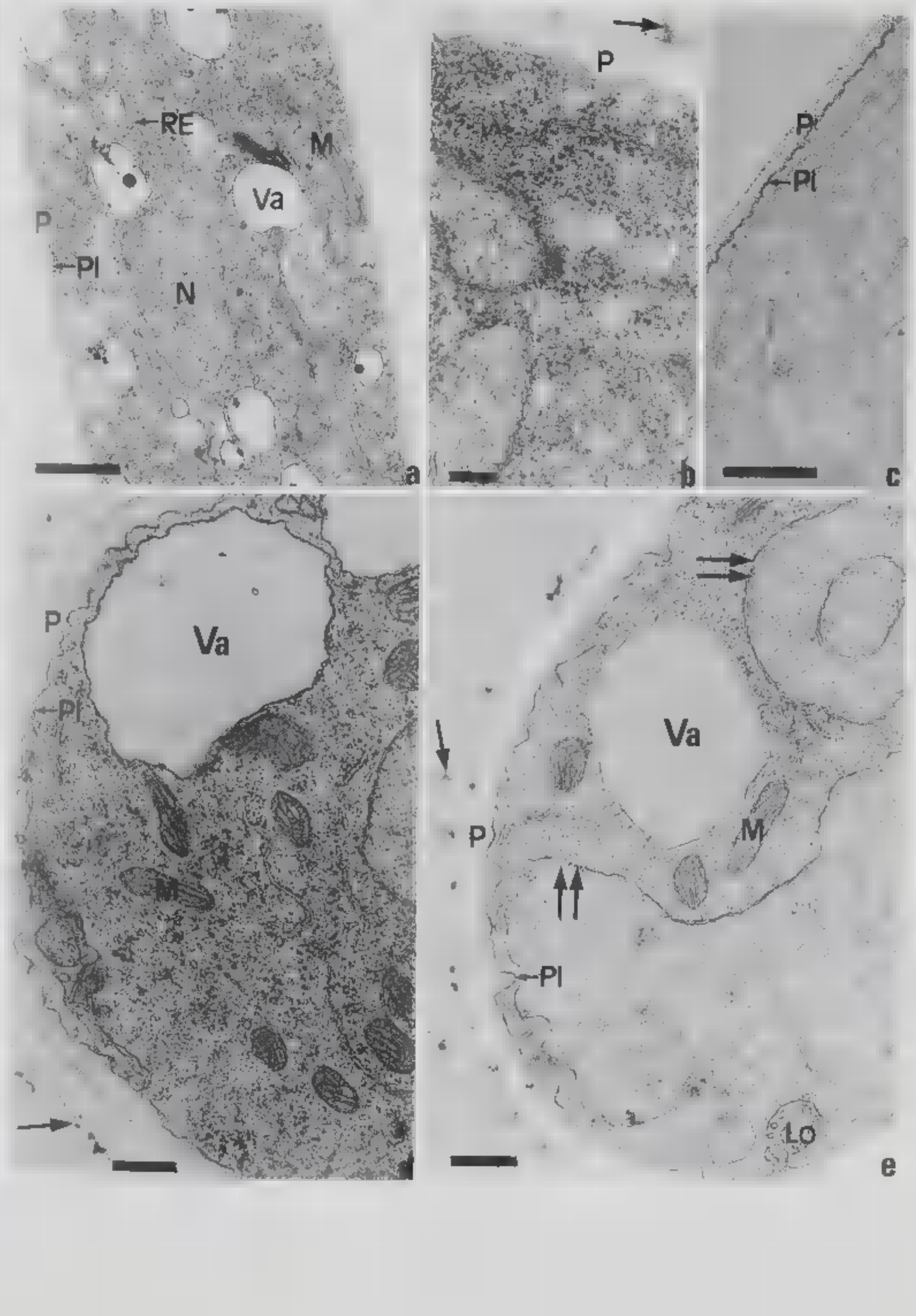
c : glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acide périodique-thiocarbo-hydraside-protéinate d'argent.

a — Coupe longitudinale passant dans la zone nucléaire d'une hyphe témoin. La Paroi (P) est transparente aux électrons et le plasmalemme est rectiligne (Pl). Le cytoplasme renferme des noyaux (N), des mitochondries (M) et du réticulum endoplasmique (RE). Dans cette zone apparaissent les premières vacuoles (Va). Echelle : 1 µ.

b — Coupe transversale passant dans la zone apicale en croissance d'une hyphe témoin. La Paroi (P) est limité extérieurement par un réseau fibrillaire d'exopolysaccharides plus ou moins dense aux électrons (flèche). Echelle : 0,1 µ.

c — Coupe longitudinale passant dans la zone apicale en croissance d'une hyphe témoin. La détection des polysaccharides par le test de Thiery montre une réaction intense au niveau de la paroi (P) et du plasmalemme (Pl). Echelle : 0,5 µ.

d-e — Coupes transversales passant dans les zones apicales en croissance d'une hyphe se développant en présence de monensine à la concentration de 10 µg/ml. La paroi (P), limitée extérieurement par des exopolysaccharides (flèche), est plus épaisse et apparaît constituée de deux couches. Le plasmalemme (Pl) est fortement festonné et les mitochondries (M) ont une matrice dense aux électrons. On note l'apparition très rapide de grandes vacuoles (Va). Des lomasomes (Lo) et des structures lytiques (double flèches), séquestrant des territoires cytoplasmiques, peuvent s'observer. Echelle : 0,5 µ.


RE
M
Va
P
Pl
N
a
P
b
P
Pl
c
P
Va
Pl
M
Va
M
P
Pl
Lo
e

	A. bisexualis		*B. cinerea*		*S. rolfsii*	
fractions	**témoin**	**Monensine**	**témoin**	**Monensine**	**témoin**	**Monensine**
F1	22,64	17,57	20,21	14,46	31,48	25,96
F2	22,81	35,90	37,64	34,66	32,02	42,84
F3	26,54	20,20	21,23	20,68	12,62	8,58
F4	28,01	26,33	21,27	30,20	23,88	22,61

Tableau 1 : Pourcentage des fractions pariétales en présence et en absence de monensine

La présence de monensine diminue fortement le développement mycélien. Les pourcentages d'inhibition sont compris entre 93 % (12[e] jour : maximum de croissance) et 100 %.

Morphologie ultrastructurale

Les coupes ont été réalisées dans les parties apicales des hyphes. Sur milieu témoin, le diamètre des hyphes varie entre 2,5 et 3 μ et l'épaisseur de la paroi n'excède pas 800 A° (Fig. 3,a). La paroi apparaît amorphe, dépourvue de stratification apparente, faiblement contrastée aux électrons après la double coloration acétate d'uranyle-citrate de plomb. Elle possède extérieurement un fin réseau fibrillaire d'exopolysaccharides plus dense aux électrons (Fig. 3,b). La réaction de Thiery donne un résultat positif et uniforme pour l'ensemble. Le plasmalemme est régulier et le cytoplasme renferme les différents systèmes endomembranaires (Fig. 3,c).

En présence de monensine (Fig. 3,d-e), le diamètre des hyphes est légèrement plus large (de 3,5 à 5,5 μ) et la paroi est plus épaisse (2 000 A°). Elle apparaît constituée de deux couches : la couche interne étant plus contrastée que la couche externe. Un réseau fibrillaire d'exopolysaccharides limite extérieurement la paroi. Le plasmalemme apparaît festonné et le cytoplasme vacuolisé renferme les différents systèmes membranaires : les mitochondries étant dans ces conditions culturales plus petites et à matrice plus dense aux électrons après coloration acétate d'uranyle-citrate de plomb.

Sur les coupes traitées par le complexe WGA-or colloïdal, nous constatons, sur micrographies d'hyphes cultivées en absence ou en présence de monensine, un marquage régulier, homogène au niveau de la paroi, plus dense en présence de l'ionophore. Aucun marquage n'est observé de façon significative au niveau du cytoplasme (Fig. 4,a-b-c). Enfin la spécificité du marquage est confirmée par les témoins : après inhibition avec le N-N'-N" triacétylchitotriose aucun marquage n'étant noté (Fig. 4,d).

Composition chimique des fractions pariétales :

Le fractionnement est réalisé par traitement successifs aux alcalis et aux acides selon Mahadevan & Tatum (1965) et la composition de chaque fraction est déterminée après hydrolyse.

Quatre fractions sont obtenues à partir des parois purifiées (tableau 1) :

— une fraction F1 extraite par NaOH 2N, précipitée par l'éthanol. Après dialyse et lyophilisation, elle représente 20,21 % des parois témoins. En présence de monensine le

pourcentage de cette fraction, par rapport au poids total des parois lyophilisées, subit une diminution importante de 28,45 %.

— une fraction F2 acido-soluble, neutralisée et lyophilisée, qui représente 37,64 % des parois témoins et qui subit une diminution d'environ 8 % en présence de l'ionophore.

— une seconde extraction alcaline du résidu conduit à la fraction F3 ; la précipitation par l'éthanol de cet extrait aboutit à l'obtention d'une quantité de matériel représentant après dialyse et lyophilisation 21,23 % des parois normales. La présence de monensine ne modifie pas le pourcentage de cette fraction.

— une fraction F4 résistante aux traitements par les alcalis et les acides représente après dialyse et lyophilisation 21,27 % des parois témoins : la présence de la monensine entraînant une augmentation de cette fraction de 42 %.

La composition de ces différentes fractions a été analysée et les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 2.

En se basant sur les résultats exprimés en pourcentage du poids de la fraction lyophilisée (%*), des parois non traitées par la monensine, la fraction F1 renferme essentiellement des oses neutres (38 %) et du phosphore (11 %) ; les fractions F2 et F3 des oses neutres (respectivement 9 % et 54 %) ; enfin dans la fraction F4 on trouve du phosphore (33 %), de la glucosamine (environ 20 %) et des acides aminés (environ 20 %). La présence de monensine n'entraîne pas de grandes variations.

Constituants		Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3		Fraction 4		Total*	
		témoin	Monensine	témoin	Monensine	témoin	Monensine	témoin	Monensine	témoin	Monensine
Oses neutres	%*	38,40	37,5	9,10	10,60	53,60	33	11,15	17,87		
	%**	7,76	5,42	3,41	3,67	11,58	6,82	2,17	5,40	24,94	21,31
Glucosamine	%*	2,58	1,16	0,33	0,57	1,46	1,40	19,40	18,20		
	%**	0,52	0,17	0,12	0,20	0,34	0,29	4,13	5,50	5,08	6,16
Ac. aminés	%*	2,10	3,11	3,10	3,09	9	4,60	19,52	11,60		
	%**	0,42	0,45	1,17	1,07	1,06	0,95	4,15	3,50	6,80	5,97
Ac. uroniques	%*	2,47	1,64	1,56	1,21	4,64	-	0,69	2,70		
	%**	0,50	0,53	0,59	0,42	0,94	-	0,15	0,82	2,23	1,77
Phosphore	%*	10,94	11,83	1,65	1,53	4,76	1,64	33,29	29,60		
	%**	2,21	1,71	0,62	0,53	1,01	0,34	7,08	8,94	10,92	11,52

NOTA : les résultats sont exprimés en pourcentage du poids de la fraction lyophilisée (%*) ou en pourcentage du poids des parois lyophilisées (%**)
Total* = pourcentage du constituant dans les parois totales

Tableau 2 : Variations de la compositions des différentes fractions extraites des parois de *B. cinerea*

Par contre les résultats exprimés en pourcentage du poids des parois lyophilisées (%**), montrent que, dans les parois témoins, les oses neutres se rencontrent au niveau des fractions F1 et F3 (respectivement 7,8 et 11,4 %), les oses aminés (4 %), les acides aminés (20 %) et le phosphore (33 %) dans la fraction F4. En présence de monensine, les proportions des différents monomères restent plus ou moins identiques dans les fractions F1, F2 et F3, alors que dans la fraction F4, on note, mis à part les acides aminés, une augmentation des différents constituants.

La précipitation éthanolique des fractions F1 et F3 extraites par la soude, laisse supposer qu'il s'agit de polysaccharides liés à des protéines. La fraction F4 est la partie chitine de la paroi : en effet on sait que le polymère de la n-acétylglucosamine se caractérise par son insolubilité dans les acides et les bases dilués. Enfin, concernant le phosphore présent en abondance dans les parois du *B. cinerea*, il subit une augmentation en présence de momensine.

Enfin, en même temps que nous avons vérifié la pureté des fractions, nous avons comparé leur aspect ultrastructural après ombrage rotatif au platine. Les micrographies choisies comme illustration représentent les parois totales ainsi que la fraction 4 (Fig. 4,e-f). N'ayant pas constaté de différences significatives entre les différentes fractions

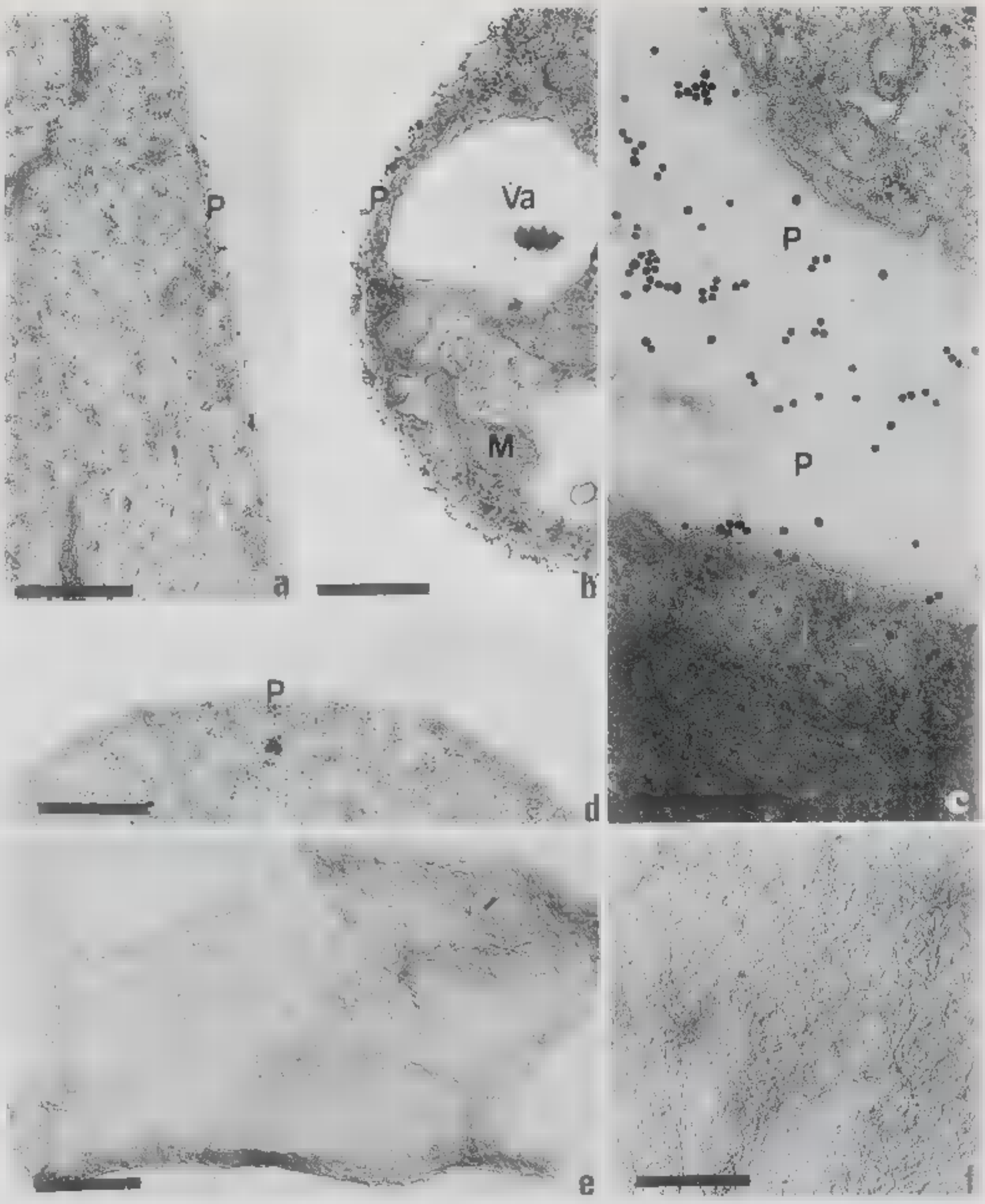


Fig. 4 a-d — Détection de la chitine par le marquage cytochimique WGA-or colloïdal : glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; WGA-Au17 ; acétate d'uranyle-citrate de plomb ;
e-f – Aspect morphologique des parois : ombrage rotatif au platine.

a — Parois (P) d'une hyphe non traitée par la monensine. Aucun marquage n'est observé de façon significative au niveau du cytoplasme : les grains étant localisés au niveau de la paroi. Echelle : 0,5 μ.
b-c — Parois (P) d'une hyphe traitée par la monensine. Nous notons une augmentation du marquage par rapport aux parois non traitées par l'ionophore. A comparer avec la Fig. 4,a. Echelle : b = 0,5 μ ; c = 0,25 μ.
e – Paroi (P) d'une hyphe non traité par la monensine, après inhibition avec le N-N′-N″ triacétyl-chitotriose. Aucun marquage n'est noté de façon significative, confirmant ainsi la spécificité du marquage. Echelle : 0,5 μ.
f – Aspect de parois totales obtenues à partir d'une culture témoin âgée de 5 jours. Echelle : 0,5 μ.
e — Aspect fibrillaire de la fraction F4 de parois obtenues à partir d'une culture se développant sur milieu témoin. Echelle : 0,5 μ.

pariétales témoin et expérience, nous ne donnerons pour illustration que les parois témoins. Les parois totales présentent un fond homogène granuleux dans lequel nous distinguons plus ou moins nettement des fibrilles enchevêtrées (Fig. 4,e) alors que la fraction F4 se caractérise par une texture fibrillaire plus nette correspondant aux fibres de chitine (Fig. 4,f).

DISCUSSION

Pour les temps d'exposition étudiés, la monensine à la concentration de 10 µg/ml n'a jamais eu un effet létal sur le *B. cinerea* : champignon filamenteux se caractérisant par un appareil de Golgi atypique. Elle inhibe sa croissance plus intensément en condition statique qu'en agitée : le pourcentage d'inhibition compris entre 93 et 100 % en culture statique, ne dépassant pas les 80 % en culture agitée (Koulali *et al.*, 1996a). Ce résultat est en accord avec des travaux antérieurs obtenus chez d'autres champignons appartenant à des groupes taxonomiques différents : cette diminution de la croissance pouvant résulter d'une inhibition de la synthèse des stérols (Weete *et al.*, 1989). En outre, Pancaldi *et al.* (1994) constatent que la monensine provoque l'inhibition de la croissance chez la forme levure du *Candida albicans*. Dans des travaux précédents, nous avons montré que, chez l'*Achlya bisexualis*, le site d'action de la monensine est l'appareil de Golgi et que sa présence dans le milieu de culture a un impact négatif sur la composition et le fonctionnement des différents systèmes endomembranaires impliqués dans les processus sécrétoires, et donc dans les mécanismes de croissance (Koulali, 1992 ; Koulali *et al.*, 1996b).

L'examen comparatif en microscopie électronique de coupes en présence ou en absence de monensine fait apparaître des différences tant au niveau du complexe plasmalemme-paroi que des cytomembranes. En présence de monensine les parois apparaissent plus épaisses et le plasmalemme est fortement festonné, des structures lomasomiques lui étant associées. Concernant les systèmes endomembranaires, les variations s'observent au niveau de l'appareil vacuolaire plus important et des mitochondries plus petites et à matrice dense aux électrons. Ces observations ultrastructurales que nous avons réalisées sur l'influence de la monensine sur des zones apicales en croissance n'avaient à notre connaissance, jamais été entreprises sur des champignons filamenteux. Cependant, ces résultats peuvent être reliés à ceux obtenus par Poli *et al.* (1986) sur des blastospores de *Candida albicans* qui montrent que la monensine affecte la synthèse de la chitine et ainsi augmente l'épaisseur de la paroi. De leur côté, Sewall *et al.* (1986) ont constaté une vacuolisation importante lors de la formation des zoogamètes et des zoospores chez *Allomyces macrogynus*. De plus chez l'*Achlya bisexualis* nous avons montré que la monensine provoque des modifications au niveau des saccules golgiens qui gonflent puis se disloquent : les dictyosomes perdant leur aspect morphologique classique (Koulali, 1992). Enfin, en ce qui concerne les mitochondries nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Mollenhauer *et al.* (1981, 1983, 1990), sur des cellules animales, puis Cunninghame & Hall (1986), Rudolph & Schnepf (1988) et Ciampolini *et al.* (1993), sur des cellules végétales, qui notent une altération des mitochondries accompagée d'une matrice dense aux électrons.

Les parois du *B. cinerea* témoins (c'est à dire en absence de monensine) constituées en majorité par des oses neutres (25 %), se caractérisent aussi par la présence d'oses aminés (5 %), d'acides aminés (environ 7 %), de phosphore en quantité relativement élevée (environ 10 %) et d'acides uroniques en quantité peu importante ne dépassent pas les 2,5 %. Elles sont classées dans le groupe chitine-glucane (Bartnicki-Garcia, 1968). La présence de l'ionophore dans le milieu de culture n'entraîne que des variations quantitatives dans la proportion des différents monomères se traduisant par une importante diminution du rapport (oses neutres + acides uroniques)/oses aminés. Nous notons également une diminution des taux des acides aminés et une augmentation du phosphore inorganique.

Nos résultats concernant le fractionnement des parois témoins se rapprochent de ceux trouvés par d'autres auteurs. Chez les espèces de type chitine-glucane, la fraction F4, résistante aux traitements par les alcalis et les acides, représente toujours la partie chitine de la paroi. Ceci a été montré chez *Neurospora crassa* (Mahadevan & Tatum, 1965), *Aspergillus niger* (Johnston, 1965), *Mucor mucedo* (El Mougith *et al.*, 1988) et *Aspergillus fumigatus* (Hearn & Sietsma, 1994 ; Ghfir, 1995). Ces mêmes auteurs ont constaté que les autres fractions (non résistantes aux différents traitements), sont constituées en grande partie par des glucanes.

La présence de la monensine dans les milieux de culture se traduit par des variations au niveau de la composition chimique des différentes fractions pariétales. Dans la fraction 4, nous notons une augmentation des oses aminés (donc de chitine), confirmant nos résultats sur les parois totales (Koulali *et al.*, 1992). Cette augmentation qui a été aussi constatée par Poli *et al.* (1986), Pancaldi *et al.* (1994) chez *Candida albicans*, serait le résultat d'une perturbation de l'enzyme intervenant dans sa synthèse, la chitine synthétase : la monensine transforme la forme inactive de l'enzyme en forme active et en agissant sur le trafic vésiculaire, provoque un déséquilibre avec prédominance des facteurs activateurs sur les facteurs inhibiteurs. Il est possible que les modifications importantes du taux de Na^+ et de K^+ dans les cellules, conduit à l'activation des proenzymes par des mécanismes différents de ceux intervenant dans le trafic vésiculaire normal (Poli *et al.*, 1986).

La monensine provoque la diminution des oses neutres au niveau des fractions F1 et F3 (fractions riches en glucanes chez le témoin). Ce résultat corrobore les observations précedemment obtenus sur la composition globale des parois fongiques (Koulali *et al.*, 1992) et peut être mis en relation avec les travaux de Rudolph & Schnepf (1988) qui ont montré que chez *Funaria hygrometrica* le nombre de rosettes impliquées dans la synthèse de la cellulose diminue très rapidement en présence de monensine. Moore *et al.* (1991), ont constaté que la monensine inhibe le transport de l'hémicellulose neutre vers la paroi. De leur côté, Zhang *et al.* (1993) dans une culture de sycomore constatent que la monensine inhibe la synthèse de la cellulose. Plus récemment, Satia-Jeunemaitre *et al.* (1994) ont montré que la biosynthèse et/ou la transformation des polysaccharides dans une culture cellulaire de sycomore sont affectés par l'ionophore. Enfin, Goubet *et al.* (1994) ont rapporté que chez le lin, la monensine induit une augmentation de l'activité de la glucane synthase II, par contre elle provoque la diminution de la glucane synthase I et de la galactane synthase, enzymes impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire.

La présence de monensine dans le milieu de culture provoque une diminution des acides aminés (donc de protéines) dans les différentes fractions pariétales, confirmant ainsi les résultats antérieurs obtenus aussi bien chez les champignons (Podila *et al.*, 1995) que chez les végétaux supérieurs. Melroy & Jones (1986) chez *Hordeum vulgare* et Sticher &

Jones (1988) chez *Zea maïs* constatent une inhibition de la sécrétion de l'amylase en présence de la monensine.

Enfin, la monensine accroît fortement la quantité de phosphore dans la fraction 4. Nous n'avons pas recherché sous quelle forme le phosphore était présent dans ces parois, ni la nature des liaisons éventuelles avec les autres polymères. Datema *et al.* (1977) pensent qu'il s'agit de polyphosphates de poids moléculaire élevé. L'accroissement de leur proportion doit modifier la structure de cette fraction pariétale.

En conclusion, nous avons montré que la monensine a un effet inhibiteur sur la croissance fongique. Elle provoque des variations dans la composition chimiques des fractions pariétales fongiques. L'ensemble de ces modifications doit être mis en relation avec les changements qui se manifestent au niveau des dictyosomes et des phénomènes sécrétoires, comme cela a été observé chez d'autres espèces végétales (Shannon & Steer 1984 ; Rudolph & Schnepf 1988 ; Moore *et al.*, 1991) et chez des champignons à appareil de Golgi typique (Koulali, 1992). Une étude cinétique sur les variations provoquées par la monensine sur les dictyosomes est actuellement en cours.

BIBLIOGRAPHIE

BARTNICKI-GARCIA S., 1968 — Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual review of microbiology* 22 : 87-108.

BLUMENKRANTZ N. & ASBOE-HANSEN G., 1973 — New method for quantitative determination of uronic acids. *Annals of biochemistry and experimental medicine* 54 : 484-489.

BOUGHARIOS G., OSMAN J., BLACK C. & OLSEN I., 1994 — Excess matrix accumulation in *scleroderma* is caused partly by differential regulation of stromelysin and TIMP-1 synthesis. *Clinica chimica acta* 231 : 69-78.

CABIB E., DURAN A. & BOWERS B., 1979 — *Localized activation of chitin synthetase in the initiation of yeast septum formation. In* : Fungal walls and hyphal growth. Burnett J. H. et Trinci A. P. J. ed., Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 189-201.

CALZONI G. L., SPERANZA A., LI Y. Q., CIAMPOLINI F. & CRESTI M., 1993 — Wall biosynthesis and wall polysaccharide composition in polen tubes of *Malus domestica* growing at low rate after monensin treatement. *Acta botanica neerlandica* 42 : 473-480.

CIAMPOLINI F., LI Y. Q., CRESTI M., CALZONI G. L. & SPERANZA A., 1993 — Disorganization of dictyosomes by monensin treatment of in-vitro germinated pollen of *Malus domestica* Borkh. *Acta botanica neerlandica* 42 : 349-355.

CUNNINGHAME M. E. & HALL J. L., 1986 — The effect of calcium antagonists and inhibitors of secretory processes on auxin-induced elongation and fine structure of *Pisum sativum* stem segments. *Protoplasma* 133 : 149-159.

DARGENT R. 1977 — *Cytodifférenciation et croissance apicale chez les champignons filamenteux (Achlya bisexualis o, Mucor mucedo, Hypomyces chlorinus).* Thèse Doctorat n° 766, Toulouse, France, pp. 187.

DATEMA R., VAN DEN ENDE H. & WESSELS J. G. H., 1977 — The hyphal wall of *Mucor mucedo*. I. Polyanionic polymers. European journal of biochemistry 80 : 611-619.

EL MOUGITH A., 1986 — *Influence de la cytochalasine A sur la morphogenèse du Mucor mucedo Linné : Conséquences cytologiques et biochimiques. Recherches sur le mode d'action de cette substance.* Thèse Doctorat d'Etat, n° 1271, Toulouse III, France, pp. 149.

FONVIEILLE J.-L., RAZKI A., TOUZE-SOULET J.-M., DARGENT R. & RAMI J., 1991 — Effect of the monensin on the lipid composition of *Achlya bisexualis*. *Mycological research* 95 : 480-483.

GEOGHEGAN W. D. & ACKERMAN G. A., 1977 — Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoïd, and anti-immunoglobulins to coloïdal gold for the indirect detection of concavalin A, wheat germ agglutinin, and goat anti human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level. A new method, theory and application. *Journal of histochemistry and cytochemistry* 25 : 1187-1200.

GHFIR B., 1995 — *Activité antifongique de l'huile essentielle d'Hyssopus oficinalis sur la croissance et la morphogenèse d'Aspergillus fumigatus (Fresenius) : conséquences cytologiques et biochimiques.* Thèse Doctorat de l'Université, n° 2060, Toulouse III, France, pp. 169.

GOODAY G. W. & TRINCI A. P. G., 1980 — *Wall structure and biosynthesis in fungi. In* : The eukaryotic microbial cell, Gooday G. W., Lloyd D. et Trinci A. P. J. ed., Cambridge University Press, Cambridge. pp. 207-251.

GOODAY G. W., 1983 — *The hyphal tip. In* : Fungal differentiation. A contemporary synthesis, Smith J.E. ed., Marcel Dekker, Inc. New York & Basel. Vol. 4. pp. 315-356.

GOUBET F., CHEKKAFI A., BRUYANT M. P. & MORVAN C., 1994 — Effects of monensin on cell wall metabolism of suspension-cultured flax cells. *Plant science* 97 : 161-168.

HARRIS J. L & TABER W. A., 1973 — Compositional studies on the cell walls of the synnema and vegetative hyphae of Ceratocystis ulmi. *Canadian journal of botany* 51 : 1147-1153.

HEARN V. M & SIETSMA J. H. 1994 — Chemical and immunological analysis of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Microbiology*, 140 : 789-795.

HODGE J. E., & HOFREITER B. T., 1962 — *Determination of reducing sugars and carbohydrates. In* : Methods in carbohydrate chemistry, Whistler R. L. & Wolfrom M. L. ed., Academic Press, New York. Vol. 1. pp. 388-389.

HOFFMANN-BENNING S., KLOMPARENS K. L. & KENDE H., 1994 — Characterization of growth-related osmiophilic particles in corn coleoptiles and deepwater rice internodes. *Annals of botany* 74 : 563-572.

JOHNSTON I. R., 1965 — The composition of the cell wall of *Aspergillus niger*. *Biochemical journal* 96 : 651-658.

KIMURA S., YAMADA M., IGAUE I. & MITSUI T., 1993 — Structure and function of the Golgi complex in rice cells — Characterization of Golgi membrane glycoproteins. *Plant and cell physiology* 34 : 855-863.

KOULALI Y., 1992 — *Influence de la monensine sur la morphogenèse fongique : Conséquences cytologiques et biochimiques chez Achlya bisexualis o Coker*. Thèse Doctorat de l'Université, n° 1175, Toulouse III, France, pp. 169.

KOULALI Y., FONVIEILLE J. L., TOUZE-SOULET J.-M., BENIZRI E. & DARGENT R., 1992 — Influence de monensine sur la composition des parois de quelques champignons filamenteux. *Canadian journal of microbiology* 38 : 277-283.

KOULALI Y., TALOUIZTE A., FONVIEILLE J. L & DARGENT R., 1996a — Influence de la monensine sur la croissance et la sécrétion des exopolysaccharides chez le *Botrytis cinerea* Pers. et le *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Canadian journal of microbiology* 42 : 965-972.

KOULALI Y., FONVIEILLE J. L., & DARGENT R., 1996b — Influence of monensin on the composition of the plasmalemma of *Achlya bisexualis* o separated by free-flow electrophoresis. *Mycological research* 100 : 551-560.

LIU C. M., 1982 — *Microbial aspects of polyether antibiotics. Activity, production, and biosynthesis. In* : Polyether antibiotics-Naturally Occurring Acid Ionophores, Westley. J. W. ed., Marcel Dekker, New York.Vol. 1, pp. 43-102.

MAHADEVAN P. R & TATUM E. L., 1965 — Relationship of the major constituents of the *Neurospora crassa* cell wall to wild-type and colonial morphology. *Journal of bacteriology* 90 : 1073-1081.

MELROY D & JONES R. L., 1986 — The effect of monensin on intracellular transport and secretion of ?-amylase isoenzymes in barley aleurone. *Planta* 167 : 252-259.

MOKRASCH L. C., 1954 — Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent. *The journal of biological chemistry* 208 : 32-55.

MOLLENHAUER H. H., ROWE L. D., CYSEWSKI S. J. & WITZEL D. A., 1981 — Ultrastructural observations in ponies after treatment with monensin. *American journal veterinary research* 42 : 35-40.

MOLLENHAUER H. H., MORRE D. J. & ROWE L. D., 1983 — Monensin toxicity : an overview. *Texas society electron microscopic journal* 14 : 12-17.

MOLLENHAUER H. H., MORRE D. J. & ROWE L. D., 1990 — Alteration of intracellular traffic by monensin : mechanis, specificity and relationship to toxicity. *Biochimica et biophysica acta* 1031 : 225-246.

MOORE P. J., SWORDS K. M. M., LYNCH M. A. & STAEHELIN L. A., 1991 — Spatial organization of the assembly pathways of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *The journal of cell biology* 112 : 589-602.

MPONA-MINGA M., COULON J & BONALY R., 1989 — Effects of subinhibitory dose of amphotericine B on cell wall biosynthesis in Candida albicans. *Research in microbiology* 140 : 95-106.

PANCALDI S., BRUNI A., DALL'OLIO G. & FASULO M. P., 1994 — Interaction of monensin on dimorphic transition and hyphal growth in *Candida albicans*. *Microbios* 79 : 163-170.

PODILA GK., ROSEN E., SAN FRANSISCO M. J. D. & KOLATTUKUDY P. E., 1995 — Targeted secretion of cutinase in *Fusarium solani f. sp. pisi* and *Colletotrichum gloesporioides*. *Phytopathology* 85 : 238-242.

POLI F., PANCALDI S. & VANNINI G. L., 1986 — The effect of monensin on chitin synthesis in *Candida albicans* blastospores. *European journal of cell biology* 42 : 79-83.

PRESSMAN B. C. & FAHIM M., 1982 — Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 22 : 465-490.

PROSSER J. & TRINCI A. P. J., 1979 — A model for hyphal growth and branching. *Journal of general microbiology* 111 : 153-164.

ROBERTS R. L, BOWERS B., SLATER M. L. & CABIB E., 1983 — Chitin synthesis and localization in cell division cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cell biology* 3 : 922-930.

RUDOLPH U. & SCHNEPF E., 1988 — Investigations of the turnover of the putative cellulose-synthetizing particle « rosettes » within theplasma membrane of *Funaria hygrometrica* protonema cells. I — Effects of monensin and cytochalasin B. *Protoplasma* 143 : 63-73.

SATIAT-JEUNEMAITRE B., FITCHETTE-LAINE A. C., ALABOUVETTE J., MARTY-MAZARS D., HAWES C., FAYE L. & MARTY F., 1994 — Differential effects of monensin on the plant secretory pathway. *Journal of experimental botany* 45 : 685-698.

SEWALL T., OLSON L., LANGE L. & POMMERVILLE J., 1986 — The effect of monensin and gametogenesis and zoosporogenesis in the aquatic fungus, *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma* 113 : 129-139.

SHANNON T. M. & STEER M. W., 1984 — The root-cap system for the evaluation of golgi inhibitors. II — Effect of potential inhibitors on slime droplet formation and structure of the secretory system. *Journal of experimental botany* 35 : 1708-1714.

SOMOGYI M., 1952 — Notes on sugar determination. *The journal of biological chemistry* 195 : 19-23.

SPIES J. R., 1957 — *Colorimetric procedures for amino acids. II — Ninhydrin method. In* : Methods in enzymology. Colowick S. P. et Kaplan N. O. ed., Academic Press Inc., Publishers. New York. Vol. 3, pp. 468-471.

STICHER L. & JONES R. L., 1988 — Monensin inhibits the secretion of a-amylase but not polysaccharide slime from seedling tissues of *Zea mays*. *Protoplasma* 142 : 36-45.

THOMAS L., 1972 — *Etude de la fermentation aérobie du Botrytis cinerea (Pers). Croissance, morphologie, isolement, identification et production d'un (1-3) (1-6) glucane*. Thèse Doctorat 3e cycle n° 1283. Toulouse France.

TRACEY M. V., 1955 — *Chitin. In* : Modern methods of plant analysis, Peach K. & Tracey M. V. ed., Springer-Verlag, Berlin. Vol. 2, pp. 264-274.

WEETE J. D., EL MOUGITH A. & TOUZE-SOULET J.-M., 1989 — Inhibition of growth, lipid and sterol biosynthesis by monensin in fungi. *Experimental mycology* 13 : 85-94.
WESSELS J. G. H., 1986 — Cell wall synthesis in apical hyphal growth. *International review of cytology* 104 : 37-79.
ZHANG G. F., DRIOUICH A. & STAEHELIN A., 1993 — Effect of monensin on plant Golgi : re-examination of the monensin-induced changes in cisternal architecture and functional activities of the Golgi apparatus of sycamore suspension-cultured cells. *Journal of cell science* 104 : 819-831.